

頭頸部癌におけるリンパ管新生

奈良県立医科大学分子病理学講座

笹平智則

LYMPHANGIOGENESIS IN HEAD AND NECK CANCER

TOMONORI SASAHIRA

Department of Molecular Pathology, Nara Medical University

Received June 19, 2009

Abstract : 現在ではリンパ節転移が成立するには既存のリンパ管から腫瘍リンパ管新生が誘導されることが不可欠であると考えられている。本稿では新生リンパ管の特徴や VEGF-C/D-VEGF-R3 をはじめとしたリンパ管新生因子について概説したのち、筆者らが見出した頭頸部癌における新規リンパ管新生誘導シグナルである HMGB1-MIA 系について述べる。

Key words : lymphangiogenesis, HMGB1, MIA

はじめに

悪性腫瘍の代表的な転移形式として播種性転移、リンパ行性転移、血行性転移などがあるが、頭頸部に発生する悪性腫瘍は唾液腺癌や一部の特殊なものを除いて大半が扁平上皮癌であり、主たる転移形式はリンパ行性転移である。既存のリンパ管は静脈内皮細胞の一部が静脈から出芽、遊走することで形成されるが、悪性腫瘍においては腫瘍細胞が分泌するリンパ管新生因子が既存のリンパ管内皮細胞に作用することで腫瘍リンパ管新生が誘導され、最終的にはリンパ節転移が成立すると考えられている。

近年のめざましい分子生物学の発展に伴う血管新生研究の進歩と相まってリンパ管新生のメカニズムも徐々に解明されつつある。本稿では代表的なリンパ管新生の分子機構について概説したあと、筆者らが見出した頭頸部癌の新規リンパ管新生調節シグナルについて紹介する。

腫瘍リンパ管の特徴とリンパ管のマーカー

悪性腫瘍においては腫瘍辺縁に肥大、拡張した新生リンパ管が存在することが多い(図 1)。肥大、拡張したリンパ管は内皮細胞の一部が断裂していたり脆弱であったりと、リンパ管本来の機能を果たしていないものも多いと思われるが、これらのうちのリンパ管としての機能を

有する新生リンパ管に腫瘍細胞が浸潤することでリンパ行性転移を引き起こす。なお腫瘍実質内に存在するリンパ管は腫瘍が増大することで圧迫されて機能不全になり、所属リンパ節にも連続していないと考えられているが、胃癌において腫瘍内リンパ管数が多いほどリンパ節転移が促進されたという報告もあり議論の余地が残るところである。上述したように、一般的には腫瘍辺縁のリンパ管数が多いほどリンパ節転移しやすくなると考えられている。

免疫組織化学におけるリンパ管内皮細胞のマーカーとしては podoplanin を認識する D2-40 や CD44 の homolog である LYVE-1 が頻用される。また homeobox gene である Prox-1 もリンパ管内皮細胞への分化を調節することも知られている。ただ D2-40 はセミノーマや中皮種、および口腔扁平上皮癌をはじめとした一部の腫瘍細胞にも陽性像をみることがあり、必ずしもリンパ管内皮細胞特異的なマーカーとは言えないことに留意する必要がある。なお微小リンパ管と微小血管は上記に記した抗体と血管内皮細胞のマーカーである CD34 を用いることで明瞭に区別することが可能である(図 2)。

リンパ管新生の分子機構

*VEGF-C/D/VEGF-R3

現在のところ腫瘍リンパ管新生において中心的な役割

を果たすと考えられているのは VEGF (vascular endothelial cell growth factor)-C/D とその受容体である VEGF-R3 系であり, *in vivo* において VEGF-C/D 発現株のマウス皮下移植モデルによりリンパ管新生, リンパ節転移が促進され, 逆に VEGF-C/D/VEGF-R3 シグナルの不活化によりリンパ管新生, リンパ節転移が抑制されることが知られている²⁻⁴. VEGF-R3 は胎生期のごく限られた時期に一過性に血管内皮細胞に発現したあとは, リンパ管内皮細胞特異的な発現をするようになり, 腫瘍細胞から分泌された VEGF-C/D と結合することで腫瘍リンパ管新生およびリンパ節転移を誘導する. 興味深い

ことに TAM (tumor-associated macrophage) にも VEGF-R3 が発現していることが知られている⁵. TAM は腫瘍の進展に伴って間質に浸潤してくる macrophage であり, 腫瘍細胞の遊走, 増殖, 生存および血管新生を促進することで予後に関与するとされるが⁶, VEGF-C/D/VEGF-R3 系を介した腫瘍リンパ管新生にも一役買っている可能性が期待される⁵. また VEGF-C は VEGF-R3 のみならず, Neuropilin-2 と結合しリンパ管新生を調節していることも報告されている⁷. 筆者らの検討では VEGF-C/D は口腔扁平上皮癌のリンパ管新生, リンパ節転移にも関与していたが⁸ VEGF-C に較べ

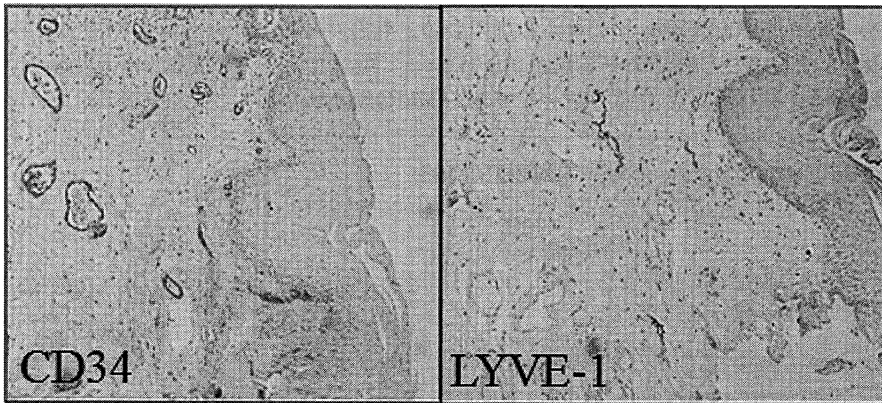


図1. 血管内皮細胞のマーカーである CD34 およびリンパ管内皮細胞のマーカーである D2-40 を用いて免疫染色したところ, 血管とリンパ管は明瞭に染め分けられている.

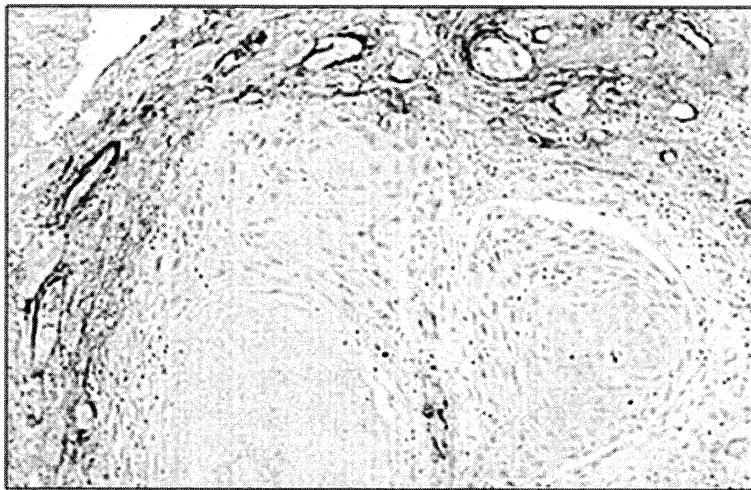


図2. 頭頸部扁平上皮癌では, 腫瘍胞巣の周囲に肥大, 拡張した新生リンパ管が多数存在する.

VEGF-Dの発現は低く、あくまでVEGF-C/VEGF-R3系がメインでVEGF-Dは補助的に作用するのではないかと考えている。

*integrin

integrinは細胞表面に存在し細胞外マトリックスと結合する接着因子で鎖と鎖からなるヘテロダイマーを形成している。integrinの多くは血管新生に関与するが、integrin α 9 β 1は先述したリンパ管内皮細胞特異的な転写因子であるProx-1と作用することでVEGF-R3の発現調節をしているとされている⁹。またVEGF-C/Dとintegrin α 9 β 1が結合することでリンパ管新生を促進することも知られている¹⁰。ほかにも腫瘍リンパ管新生されたリンパ管内皮細胞にはintegrin α 4 β 1が発現しており、そのantagonist処理によりリンパ管新生ならびに転移が抑制されたという報告もある¹¹。このように一部のintegrinがリンパ管新生に関与することが明らかとなっている。

*PDGF-BB/PDGFR- β

PDGF (platelet derived growth factor) -BB/PDGFR- β 系は血管リモデリングの際に血管とペリサイト間で働くと考えられてきたが、2004年にCaoらがPDGFR- β はリンパ管内皮細胞にも発現が見られ、PDGF-BBと作用することで腫瘍リンパ管新生、リンパ節転移を促進し、さらにPDGF-BB/PDGFR- β 系により誘導されるリンパ管新生はVEGF-C/D/VEGF-R3シグナルを阻害しても抑制されないということを明らかにした¹²。これらの知見はPDGF-BB/PDGFR- β 系はVEGF-C/D/VEGF-R3系とは全く独立してリンパ管新生に関与することを示唆するものであり、今後の研究が待たれるところである。

*VEGF/VEGFR2

VEGF/VEGFR2系は言わずと知れた代表的な血管新生因子であるが、ケラチン14プロモーターで表皮にVEGFを強制発現させたVEGFトランスジェニックマウスによるDMBA/PMAを用いた多段階発癌モデルでは、乳頭腫から扁平上皮癌に移行した組織中にはLYVE-1陽性のリンパ管が多数確認されている。また野生型と比較してVEGF過剰発現群で有意にリンパ節転移の頻度が高く、さらにVEGF過剰発現群ではリンパ節転移に先立ってリンパ節内でリンパ管新生が起きることで腫瘍細胞のリンパ行性転移を容易にしていることを明らかにしている^{13,14}。筆者らもELISA法ならびに免疫組織化学による検討の結果、口腔扁平上皮癌細胞が分泌するVEGFレベルは原発層におけるLYVE-1陽性リンパ管数およびリンパ節転移と相関することを見出している。VEGF/VEGFR2系とリンパ管新生の関係はまだまだ不

明な点が多いが、現在、本邦において「治療切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌」の治療薬として使用されているVEGF中和抗体であるbevacizumab(商品名アバスタン®)が、リンパ節転移陽性の扁平上皮癌患者にも有効である可能性もありそうである。

*その他のリンパ管新生因子

血管新生の際の血管リモデリングに不可欠な役割を担うAngiopoietin-1/2/Tie2系にもリンパ管新生作用があることが分かっている¹⁵⁻¹⁷。また血管新生を抑制するがん抑制遺伝子であるEndostatinはリンパ管新生およびリンパ節転移も抑制することが、表皮基底細胞にEndostatinを過剰発現させたトランスジェニックマウスによる多段階発癌実験で確認されている¹⁸。さらにClasperらはVEGF-Cを遺伝子導入したマウス線維肉腫細胞株T241を移植したマウスより分離されたリンパ管内皮細胞と、正常のマウスリンパ管内皮細胞をAffymetrix社のGeneChipによるマイクロアレイにより網羅的遺伝子発現解析したところ、細胞外マトリックス、接着因子、血管関連因子をはじめとした多数の遺伝子発現パターンの違いがみられたと報告している¹⁹。リンパ管新生は血管新生よりも比較的新しい分野のためまだまだ未知の部分も多く、今後も新たな関連因子の発見が相次ぐことが考えられる。

頭頸部癌におけるHMGB1シグナル

HMGB1 (high mobility group box-1)は核クロマチンタンパクであり、本来は核内でDNAの構造・機能維持、転写の調節などに関与しているが、細胞の壊死により細胞外に放出されるサイトカインとしての機能も有する²⁰。HMGB1の細胞外への分泌機構は不明な点が多いが、筆者らはTGF- α とIL-15が核内から細胞質への移行や細胞外への分泌を促進することを見出している²¹。細胞外に分泌されたHMGB1は受容体であるRAGE (receptor for advanced glycation end products)と結合することでMAPK, Rac1/Cdc42, NF κ B等の細胞内シグナルを活性化し胃癌、大腸癌、前立腺癌等の浸潤・転移、予後に関与し²²⁻²⁶、また大腸腺腫の癌化を促進する²⁷。口腔扁平上皮癌ではHMGB1-RAGE系は局所進展に関与すると同時に独立した予後不良因子であり(図3)、さらにRAGEの発現レベルと腫瘍血管数、VEGF発現レベルは有意に相関していることも筆者らは明らかにしている^{28,29}。

一方、核内HMGB1はMIA (melanoma inhibitory activity)を活性化させるという機能も有する。MIAはメラノーマHT29細胞の培養上清から見つかった11-kDa

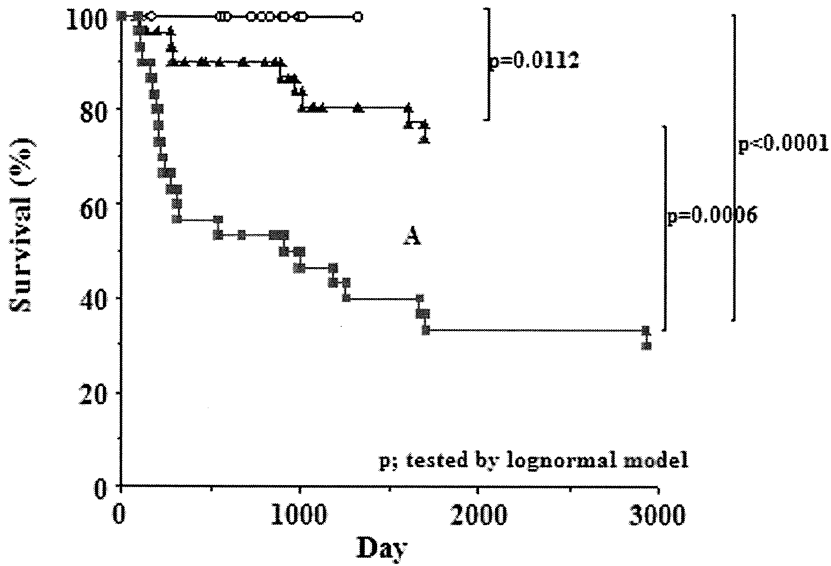


図3. 口腔扁平上皮癌においてRAGE発現症例は非発現症例と比較して有意に予後不良であった. それぞれ○はRAGE非発現症例, △はRAGE発現症例, □はRAGE強発現症例を表す.

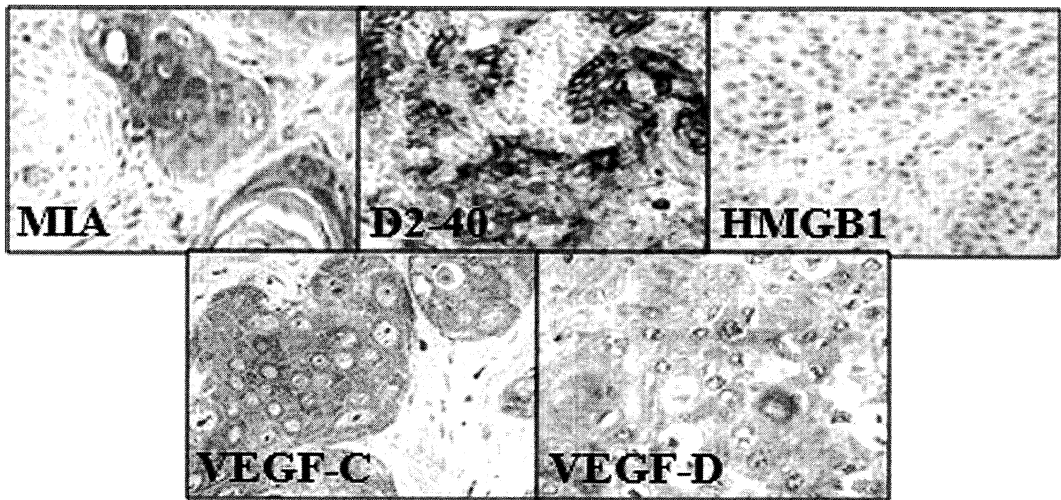


図4. MIAの発現レベルはリンパ管数, HMGB1発現レベル, およびVEGF-C/D発現レベルとよく相関していた.

の分泌タンパクで³⁰⁾, 当初はメラノーマの進展を抑制される物質とされていたが⁸⁾, 現在ではメラノーマや軟骨肉腫等の進展に^{31, 32)}, また胃癌の有用な血清マーカーとなり得ることも明らかとなっている³³⁾. MIAは細胞表面の integrin α 4 β 1, integrin α 5 β 1に直接結合し, 両者のリガ

ンドである fibronectin との結合を阻害する³⁴⁾. また MIA は SH3 ドメイン様の構造を有しており, 同部を介して fibronectin とも結合する³⁵⁾. しかしながら MIA が腫瘍リンパ管新生, リンパ節転移に及ぼす影響については全く詳細不明であった. 筆者らは 62 例の口腔扁平上皮癌を材

料に MIA の発現と臨床病理学的因子との関連を免疫組織化学的に解析したところ、リンパ節転移症例ほど MIA を高発現しており、MIA の発現レベルと核内 HMGB1 labeling index, 新生リンパ管数, ならびに VEGF-C/D の発現レベルとの間に密接な関係がみられた(図 4)。なお原発巣で MIA の発現が低くても、リンパ節転移巣では MIA の発現レベルが亢進することも確認している。in vitro での検討では HSC4 細胞(非転移株)と比較して転移株である HSC3 細胞の方が MIA, HMGB1, NFκB p65

の発現レベル, および HMGB1 と NFκB p65 の結合レベルが高かった(図 5)。またアンチセンス処理ならびに siRNA 処理により HMGB1 を knockdown することにより MIA の発現も抑制された(図 6A)。口腔扁平上皮癌では MIA のプロモーター領域に HMGB1 と NFκB p65 が結合することで MIA の遺伝子発現が亢進することが明らかとなった。次に MIA の細胞内シグナルを明らかにするため、MIA の受容体のひとつである integrin $\alpha 5\beta 1$ を発現している HSC3 細胞を HMGB1 抗体を用いて中和処

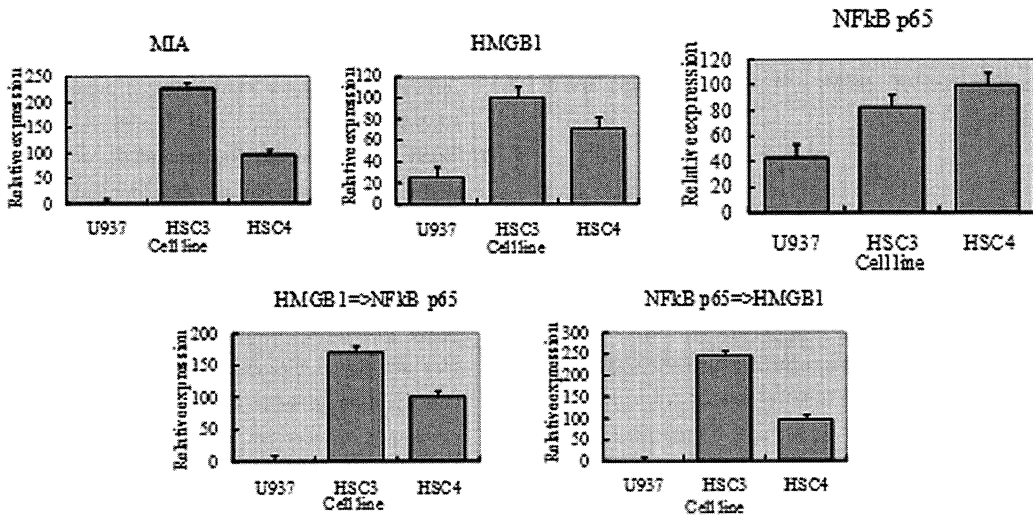


図 5. 転移株である HSC3 細胞の方が MIA, HMGB1, NFκB p65 の発現レベル, および HMGB1 と NFκB p65 の結合レベルが高かった。

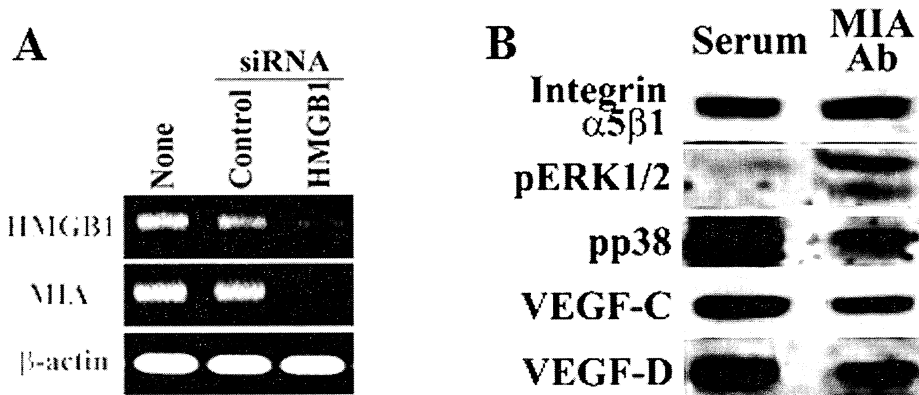


図 6. A, HSC3 細胞を HMGB1 siRNA 処理したところ、MIA の発現は消失した。B, HSC3 細胞を MIA 抗体で中和処理したところ ERK のリン酸化が亢進し、逆に MAPK p38 のリン酸化、VEGF-C/D の発現が低下した。

理したところ ERK1/2 のリン酸化が上昇し、逆に MAPK p38 のリン酸化と VEGF-C/D の発現低下が確認された (図 6B). また MAPK p38 の inhibitor である SB239063 で処理することでも VEGF-C/D の発現は減弱した。以上の結果より、口腔扁平上皮癌では MIA のプロモーター領域に HMGB1 と NFκB p65 が結合することで MIA の遺伝子発現が亢進し、MIA は MAPK p38 のリン酸化を介して VEGF-C/D の発現を上昇させ、腫瘍リンパ管新生を誘導しリンパ節転移を促進することが明らかとなった⁸⁾。MIA をターゲットとした分子標的治療は頭頸部扁平上皮癌に有用であるかもしれない。また ELISA 法により MIA は頭頸部扁平上皮癌患者の血清や唾液中にも非癌患者と比較して高レベルに検出されることを見出しており (未発表データ)、腫瘍マーカーとしての応用も期待される。

おわりに

本稿ではリンパ管新生に焦点を当ててきたが、まだまだ課題は多いと考えている。新生リンパ管と既存のリンパ管を区別することは困難であるし、リンパ管新生をターゲットとする分子治療も臨床応用の域に達していない。しかしながらリンパ管新生関連因子の検索は腫瘍細胞のリンパ節転移のメカニズムを明らかにする上で不可欠であり、今後も次々と得られるであろう知見をもとに、一日も早く抗リンパ管新生療法の臨床応用が実現されることを願う次第である。

謝 辞

本稿を終了するにあたり、このような研究の場を与えて下さり様々な助言や叱咤激励を頂戴した奈良県立医科大学分子病理学講座の國安弘基教授、ならびに口腔外科学講座の桐田忠昭教授に深謝する次第です。

文 献

- 1) Shimizu, K., Kubo, H., Yamaguchi, K., *et al.* : Suppression of VEGFR-3 signaling inhibits lymph node metastasis in gastric cancer. *Cancer Sci.* **95**(4) : 328-33, 2004.
- 2) Skobe, M., Hawighorst, T., Jackson, D. G., *et al.* : Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat. Med.* **7**(2) : 192-8, 2001.
- 3) Stacker, S. A., Caesar, C., Baldwin, M. E, *et al.* : VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat. Med.* **7**(2) : 186-91, 2001.
- 4) He, Y, Kozaki, K., Karpanen, T., *et al.* : Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**(11) : 819-25, 2002.
- 5) Schoppmann, S. F., Birner, P., Stockl, J., *et al.* : Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am. J. Pathol.* **161**(3) : 947-56, 2002.
- 6) Toi, M., Ueno, T., Matsumoto, H., *et al.* : Significance of thymidine phosphorylase as a marker of protumor monocytes in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **5**(5) : 1131-7, 1999.
- 7) Yuan, L., Moyon, D., Pardanaud, L., *et al.* : Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development.* **129**(20) : 4797-806, 2002.
- 8) Sasahira, T., Kirita, T., Oue N, *et al.* : High mobility group box-1-inducible melanoma inhibitory activity is associated with nodal metastasis and lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* **99**(9) : 1806-12, 2008;
- 9) Mishima, K., Watabe, T., Saito, A., *et al.* : Prox1 induces lymphatic endothelial differentiation via integrin alpha9 and other signaling cascades. *Mol. Biol. Cell* **18**(4):1421-9, 2007.
- 10) Vlahakis, N. E., Young, B. A., Atakilit, A., Sheppard, D. : The lymphangiogenic vascular endothelial growth factors VEGF-C and -D are ligands for the integrin alpha9beta1. *J. Biol. Chem.* **280**(6) : 4544-52, 2005.
- 11) Garmy-Susini, B., Makale, M., Fuster, M., Varner J. A. : Methods to study lymphatic vessel integrins. *Methods Enzymol.* **426** : 415-38, 2007.
- 12) Cao, R, Bjorndahl, M. A., Religa, P., *et al.* : PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *Cancer Cell* **6**(4) : 333-45, 2004.
- 13) Detmar, M., Hirakawa, S. : The formation of lymphatic vessels and its importance in the setting of malignancy. *J. Exp. Med.* **196**(6) : 713-8, 2002.

- 14) **Hirakawa, S., Kodama, S., Kunstfeld, R., Kajiyama, K., Brown, L. F., Detmar, M.** : VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J. Exp. Med.* **201**(7) : 1089-99, 2005.
- 15) **Gale, N. W., Thurston, G., Hackett, S. F., et al.** : Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev. Cell* **3**(3) : 411-23, 2002.
- 16) **Tammela, T., Saariisto, A., Lohela, M., et al.** : Angiopoietin-1 promotes lymphatic sprouting and hyperplasia. *Blood* **105**(12) : 4642-8, 2005.
- 17) **Morisada, T., Oike, Y., Yamada, Y., et al.** : Angiopoietin-1 promotes LYVE-1-positive lymphatic vessel formation. *Blood* **105**(12) : 4649-56, 2005.
- 18) **Brideau, G., Makinen, M. J., Elamaa, H., et al.** : Endostatin overexpression inhibits lymphangiogenesis and lymph node metastasis in mice. *Cancer Res.* **67**(24) : 11528-35, 2007.
- 19) **Clasper, S., Royston, D., Baban, D., et al.** : A novel gene expression profile in lymphatics associated with tumor growth and nodal metastasis. *Cancer Res.* **68**(18) : 7293-303, 2008.
- 20) **El Gazzar, M., Yoza, B. K., Chen, X., Garcia, B. A., Young, N. L. and McCall, C. E.** : Chromatin-specific remodeling by HMGB1 and linker histone H1 silences proinflammatory genes during endotoxin tolerance. *Mol. Cell Biol.* **29**(7) : 1959-71, 2009.
- 21) **Sasahira, T., Sasaki, T. and Kuniyasu, H.** : Interleukin-15 and transforming growth factor alpha are associated with depletion of tumor-associated macrophages in colon cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **24**(1) : 69-74, 2005.
- 22) **Kuniyasu, H., Oue, N., Wakikawa, A., et al.** : Expression of receptors for advanced glycation end-products (RAGE) is closely associated with the invasive and metastatic activity of gastric cancer. *J. Pathol.* **196**(2) : 163-70, 2002.
- 23) **Kuniyasu, H., Chihara, Y., Takahashi, T.** : Co-expression of receptor for advanced glycation end products and the ligand amphoterin associates closely with metastasis of colorectal cancer. *Oncol. Rep.* **10**(2) : 445-8, 2003.
- 24) **Kuniyasu, H., Chihara, Y. and Kondo, H.** : Differential effects between amphoterin and advanced glycation end products on colon cancer cells. *Int. J. Cancer* **104**(6) : 722-7, 2003.
- 25) **Kuniyasu, H., Chihara, Y., Kondo, H., Ohmori, H. and Ukai, R.** : Amphoterin induction in prostatic stromal cells by androgen deprivation is associated with metastatic prostate cancer. *Oncol Rep* **10**(6) : 1863-8, 2003.
- 26) **Kuniyasu, H., Yano, S., Sasaki, T., Sasahira, T., Sone, S., Ohmori, H.** : Colon cancer cell-derived high mobility group 1/amphoterin induces growth inhibition and apoptosis in macrophages. *Am. J. Pathol.* **166**(3) : 751-60, 2005.
- 27) **Sasahira, T., Akama, Y., Fujii, K. and Kuniyasu, H.** : Expression of receptor for advanced glycation end products and HMGB1/amphoterin in colorectal adenomas. *Virchows. Arch.* **446**(4) : 411-5, 2005.
- 28) **Sasahira, T., Kirita, T., Bhawal, U. K., et al.** : Receptor for advanced glycation end products (RAGE) is important in the prediction of recurrence in human oral squamous cell carcinoma. *Histopathology* **51**(2) : 166-72, 2007.
- 29) **Sasahira, T., Kirita, T., Bhawal, U. K., et al.** : The expression of receptor for advanced glycation end products is associated with angiogenesis in human oral squamous cell carcinoma. *Virchows. Arch.* **450**(3) : 287-95, 2007.
- 30) **Blesch, A., Bosserhoff, A. K., Apfel, R., et al.** : Cloning of a novel malignant melanoma-derived growth-regulatory protein, MIA. *Cancer Res.* **54**(21) : 5695-701, 1994.
- 31) **Rothhammer, T. and Bosserhoff, A. K.** : Influence of melanoma inhibitory activity on transforming growth factor-beta signaling in malignant melanoma. *Melanoma. Res.* **16**(4) : 309-16, 2006.
- 32) **Yonekawa, M., Kondo, S., Sugiura, H., et al.** : Serum cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein (CD-RAP) levels in swarm rat chondrosarcoma. *J. Orthop. Res.* **20**(2) : 382-6, 2002.
- 33) **Aung, P. P., Oue, N., Mitani, Y., et al.** : System-

atic search for gastric cancer-specific genes based on SAGE data: melanoma inhibitory activity and matrix metalloproteinase-10 are novel prognostic factors in patients with gastric cancer. *Oncogene* **25**(17) : 2546-57, 2006.

34) **Bauer, R., Humphries, M., Fassler, R., Winklmeier, A., Craig, S. E. and Bosserhoff, A. K.** : Regulation of integrin activity by MIA. *J. Biol. Chem.* **281**(17) : 11669-77, 2006.